

**Az oligopeptidázok szerkezete és működése:
katalízis az S9A enzimsaládban**

A doktori értekezés tézisei

Juhász Tünde



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna, az MTA levelező tagja

Szerkezeti Biológia Program

Programvezető: Prof. Gráf László, az MTA rendes tagja

Témavezető: Prof. Polgár László, az MTA doktora

Tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ,
Enzimológiai Intézet

2010

Bevezetés

A dolgozat tárgyát képező két enzim a proлил-oligopeptidáz (POP) és az oligopeptidáz B (OPB). A POP kapcsolatba hozható a központi idegrendszer többféle zavarával, inhibitorai javítják a kognitív képességeket. Az OPB a tripanoszómák sejtekbe történő behatolását segíti elő, inhibitoraival a paraziták inváziója gátolható.

Mindkét enzim egy viszonylag új szerin-proteáz család, a proлил-oligopeptidáz család (SC klán, S9 család) tagja. Azon belül azonos alcsaládba (S9A) is tartoznak. A családba tartozó fehérjék két doménből állnak: egy α/β -hidroláz feltekeredésű katalitikus peptidázból, mely inkább a lipázokkal semmint a kisméretű szerin-proteázokkal (pl. tripszinnel) rokon és egy regulátor β -propellerből. A sertés POP esetében a peptidáz domén az 1-72 és 428-710 aminosavakból épül fel, a közbenső rész alkotja a propeller domént. A POP 7-lemezes propellere ún. nyitott *velcro* topológiájú, melynek jellegzetessége, hogy a propeller első és utolsó lemeze közötti kapcsolatot kizárólag hidrofób kölcsönhatások biztosítják.

A propeller eltakarja a két domén közötti nagyobb üregben található aktív helyet, ezáltal biztosítja a családot jellemző szubsztrátszelektivitást: a nagy, strukturált peptidek kizárását, az oligopeptid szubsztrátok kiválogatódását. Ugyanakkor a sertés POP látszólag merev, zárt fehérjét mutató kristályszerkezetében nem azonosítható szubsztátbejáratnak alkalmas nyílás: a szubsztrát aktív helyre jutása a szerkezet kinyílással járó gyors konformációváltozását igényli. Bár a propeller központi csatornájának bejárata túl szűk egy átlagos méretű peptid számára, elképzelhető ennek megnagyobbodása a propeller lemezeinek egymástól való (részleges) eltávolodásával, ami már lehetővé tenné a szubsztrát bejutását a propeller felől. A propeller lemezei valóban végeznek egyfajta oszcilláló mozgást, amire az mutatott rá, hogy az 1. és 7. lemez diszulfidhíddal való összekötése az enzim inaktiválódásával járt. Másik lehetőségként a szubsztrát a két domén eltávolodásával a köztük levő rés megnagyobbodása árán is megközelítheti az aktív helyet, ahogy azt a fehérjék hasítására is képes, kompakt *Pyrococcus furiosus* (Pfu) POP esetében feltételezték.

Az OPB működését kristályszerkezet hiányában kinetikai mérésekkel jellemezték. Ismert, hogy bázikus aminosavknál, elsősorban bázispároknál hasít – utóbbiak után kiemelkedő hatékonysággal. Kis, szintetikus szubsztrátokkal végzett vizsgálatok azt is megmutatták, hogy az OPB és a POP viselkedése több tekintetben hasonló: mindkét enzim érzékeny az ionerősségre, a specifikációs állandó pH-függése komplex görbét ad, katalízisükben szubsztrát-kiváltotta konformációváltozás látszik sebességmeghatározónak.

Célkitűzések

Munkánk célja annak feltárása, hogy a működéshez nélkülözhetetlen enzimszoportok milyen mértékben járulnak hozzá a katalízishez. Kiemelt figyelmet szentelünk annak kiderítésére, hogy mi a titka az oligopeptidáz aktivitásnak.

1. A katalitikus triád a szerin-proteázok körében alapvető fontosságú a katalízis szempontjából. A klasszikus szerin-proteázoknál a Ser-His-Asp triád aszparaginsav tagjának szerepét többféleképpen is értelmezték. A sertés POP katalitikus triádjának aszpartát tagja az Asp641; a D641A és D641N variánsokon keresztül tanulmányozzuk az Asp641 katalízisben betöltött szerepét, egyúttal a katalitikus triád működését.
2. A szerin-proteázok általi katalízisben az oxianion-kötőhely is fontos szerepet játszik. Az OPB és a POP közötti szekvenciahasonlóság alapján az *E. Coli* OPB oxianion-kötőhelyén is egy tirozin (Tyr452) található; a Tyr452Phe mutáns vizsgálatával jellemezzük az oxianion-kötőhely katalízishez való hozzájárulását.
3. A szubsztrátspecifitást az enzim szubsztrátkötőhelyei határozzák meg. Valódi peptid-szubsztrátokkal végzett kinetikai mérésekkel tanulmányozzuk az *E. Coli* OPB enzim szubsztrátfelismerését, szubsztrátkötőhelyeit.
4. Az oligopeptidázok működésének jellegzetessége, hogy az enzimek a propeller segítségével szűrik ki oligopeptid szubsztrátjaikat, de hogy miképpen éri el a szubsztrát az aktív helyet, nem egyértelmű. A kérdéses útvonal és mechanizmus feltárásához vizsgáljuk a POP esetében a két domén közötti, ill. a propelleren keresztüli bejutás lehetőségét.
5. A családba tartozó proteázok között számon tartanak néhány olyan kivételes enzimet, melyek szigorú értelemben nem oligopeptidázok, hiszen nagyobb peptideket, fehérjéket is hidrolizálnak. A *Pyrococcus furiosus* POP enzimmel kapcsolatban is arról számoltak be, hogy képes fehérjék hasítására. A termofil enzim kinetikai viselkedésének tervezett vizsgálata választ adhat arra, miként magyarázható a családra nem jellemző aktivitás.

Alkalmazott módszerek

- enzimpreparálás: rekombináns fehérjék kifejezése (*E. coli* rendszerben) és tisztítása, helyspecifikus mutagenézis
- enzimkinetika: aktivitásmérés, szubsztrátkötés, enzimgátlás, enzimreakciók kinetikai és aktiválási paramétereinek meghatározása
- fehérjestabilitási vizsgálatok - denaturációs és refolding kísérletek
- fehérjék kémiai módosítása: alkilálás, diszulfidhidak kialakítása
- technikák: PCR; különféle kromatográfiák; gélelektroforézis; differenciális pásztázó kalorimetria; ultraibolya-látható, fluoreszcencia és cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

Eredmények és következtetések

1. A sertés prolil-oligopeptidáz katalitikus triádja

- A D641A és a D641N mutánsokkal mért aktivitások hasonló mértékben változtak a natív enzimhez viszonyítva: a katalitikus Asp negatív töltésének a jelenléte a fontos a katalízis során.
- A variánsok nitrofenilészter szubsztráttal mért kinetikus specificitási állandójának értékei a natívval összemérhetőek maradtak, míg egy tioészter, egy amid- és egy valódi peptid-szubsztráttal a natívhoz képest 2, 3 ill. 6 nagyságrenddel csökkent az aktivitás: az Asp641 cseréjével elrontott aktív hely erősebb kötést nehezebben képes hasítani, az Asp641 hozzájárulása erősen szubsztrátfüggő. Az aktivitás ilyen a szubsztrát minőségétől való függését a tripszinnél nem tapasztalták.
- A csökkent aktivitás a mutánsok esetén az egész pH-tartományban fennállt, ellentétben a tripszinnel, amelynél a lúgos pH-kon a csökkenés mértéke jóval kisebb volt.
- Mind a D641A-, mind a D641N-variáns kristályszerkezetében a katalitikus hisztidin (His680) pozíciója a natív enzimben elfoglalttal azonos, szubsztrát jelenlétében is, azaz a His680 a megfelelő tautomer formában van jelen: a k_{cat}/K_m -ben bekövetkezett csökkenés oka nem a nem megfelelő His-tautomer stabilizációja, mint a tripszin D102 mutánsa esetében.

2. Az *E. coli* oligopeptidáz B oxianion-kötőhelye

- Az oxianion-kötőhelyen a Tyr452 Phe-ra való cseréje nem egyforma mértékben befolyásolta az enzim különböző szubsztrátokkal szembeni aktivitását: az amid- és peptidszubsztrátok többségénél közelítőleg két nagyságrendnyi, egy rövid, kevésbé specifikus amidszubsztráttal három nagyságrendnyi aktivitáscsökkenést okozott, míg az észterszubsztrátokkal mért specifikitási állandók látszólag nem változtak. Az *E. coli* OPB oxianion-kötőhelyén a Tyr OH-csoportja általi stabilizáció jelentős és szubsztrátfüggő.
- Az Y452F mutáns esetében egy rövid, kevésbé specifikus észterszubsztráttal nemproduktív kötést tapasztaltunk, míg a natív enzim esetében nem. Az oxianion-kötőhely részt vesz az esetleges nemproduktív kötés megszüntetésében.

3. Az *E. coli* oligopeptidáz B szubsztrátkötőhelyei

- Az *E. Coli* OPB aktivitása erősen függ az ionerősségtől: a szubsztrátok kötése ionos természetű. A csak egy, ill. az egy pár bázikus aminosavat tartalmazó peptidszubsztrátok sófüggése különböző.
- Kimutattuk, hogy a specifikus szubsztrátok két argininjának kötését az S2 helyhez hasonlóan az S1 helyen is egy karboxil-diád (Asp460, Asp462 és Glu576, Glu578) végezheti.
- Több szubsztráttal tapasztaltunk magas szubsztrátkoncentrációknál szubsztrátgátlást, melynek mechanizmusa az egy, ill. két arginint tartalmazó szubsztrátokkal eltért. A gátlásban érintettek a szubsztrátkötőhelyek.
- Millimoláris koncentrációjú Ca^{2+} és Mg^{2+} -sók jelenlétében magasabb specifikitási állandók mérhetők az egy arginint tartalmazó szubsztrátokkal. Ezek a sók a $\text{pH-}k_{\text{cat}}/K_m$ profil is leegyszerűsítik. Mindkét viselkedésért a szubsztrátkötőhelyek Ca^{2+} -kötése tehető felelőssé.

4. A protil-oligopeptidáz: miképpen juthat a szubsztrát az enzim aktív centrumába?

- Diszulfidhidak beépítésével a propeller doménbe és a két domén közé feltérképeztük, hogy mely részek elmozdulása szükséges a sertés POP aktivához. A propeller 1. és 7. lemeze közé, a propeller peptidázról távolabbi végébe tervezett diszulfidhíd kialakítása nem járt sikerrel. Ugyancsak a propellerbe, de a peptidáz doménhez közeli régióba tervezett diszulfidhíd kialakult: a kötés létrejöttével párhuzamosan az enzim veszített aktivitásából. A két domén közé tervezett diszulfidhíd könnyedén kialakult, és az enzim

inaktiválódásával járt. A domének közötti keresztkötés egy oktapeptid szubsztrát kötődését is megakadályozta. Az eredmények arra utalnak, hogy a POP aktivitásához szükség van a propeller lapátjainak egymáshoz képesti elmozdulására, és ugyancsak szükséges a két domén egymástól távolodó elmozdulása is. Utóbbi a szubsztrát kötődéséhez is elengedhetetlen.

- A sertés POP *velcro* nélküli 7-lemezes propellere önállóan kifejezhető, sőt rövidebb, 6-lemezes változata is elkészíthető, bár a mesterséges propeller oligomerizációra és aggregációra hajlamosabb. A propellerszerkezet önmagában is életképes, kialakulása nem köthető szigorú feltételekhez.
- A POP önálló propellere kifejezetten stabil: a denaturáló hatásoknak jobban ellenáll, mint a teljes POP enzim. A propellert az enzimben a proteáz doménnel való kapcsolódása labilizálja, ami a katalízishez szükséges mozgásokat segítheti elő. A propeller stabilitása azt is jelzi, hogy kinyílása nem várható, a szubsztrát nem rajta át, sokkal inkább a két domén között érheti el az aktív helyet.
- Együtműködésben végzett *in silico* számítások a sertés POP esetében a szubsztrát számára egyetlen lehetséges bejáratként egy kisebb üreget mutattak a két domén között. Az üreg kialakításában részt vesz a peptidáz domén N-terminális részének 10-40 aminosavak alkotta szakasza. Mivel a sertés POP N-terminálison csonkított változatait ($\Delta 55$ ill. $\Delta 71$) nem tudtuk oldható formában kifejezni, ennek a résznek a szerepét nem tudtuk tanulmányozni. A *Pfu* POP $\Delta 32$ variánsa viszont preparálható volt és bár aktivitása, kinetikai és aktiválási paraméterei csak csekély mértékben tértek el a natív enzim megfelelő értékeitől, stabilitása messze elmaradt a natív termofil enzimétől. A *Pfu* POP esetében az N-terminális rész szerepet játszik a megfelelő fehérjeszerkezet kialakításában.
- A számításokkal azonosított bejárat üreg kialakításában résztvevő másik rész a propellerhez tartozó, 192-205 aminosavak alkotta flexibilis hurok. A hurok limitált proteolízises hasításával nyert enzim aktívabbnak bizonyult, mint a vad típusú POP, emellett a szubsztrát kötődésével összefüggő kinetikai és aktiválási paraméterei is eltértek a natív enzim megfelelő paramétereitől. A 192-205 huroknak van befolyása a szubsztrát kötődésére, feltehetően a szubsztrát bejutási útvonalaiban helyezkedik el.

5. A *Pyrococcus furiosus* prolin-oligopeptidáz kinetikai jellemzése

A termofil enzim általi katalízis számos jellemzője eltér az irodalomban korábban közöltektől, melyek közül a legfontosabbak:

- a *Pfu* POP csak jelentéktelen mértékben, a tripszinnél ~2500-szor gyengébben hasítja az azokazein szubsztrátot: az enzim alapvetően oligopeptidáz, azaz kisméretű peptidok hasítására alkalmas.
- a *Pfu* POP nem autolizál, hanem magas hőmérsékleten hosszú ideig történő inkubálása során csupán kismértékű, igen lassan bekövetkező, rendes enzimreakcióként nem értékelhető hasadása tapasztalható. A fehérjék hidrolízisének az szab gátat, hogy a nagy szubsztrátok a zárt enzimformába nem férnek be. A nyitott forma pedig inaktív, mert a kinyílással a katalitikus triád szerkezete eltorzul.

Összefoglalás

A prolin-oligopeptidáz család S9A alcsaládjába tartozó két szerin-proteáz működését tanulmányoztuk. Eredményeink röviden:

- A prolin-oligopeptidáz aktív helyén az aszparaginsav negatív töltése révén biztosítja a katalitikus triád töltéssztabilizáló rendszerként való működését.
- Az oligopeptidáz B katalízisének különlegessége, hogy az oxianion-kötőhely nemcsak elektrofil katalizátorként hatékony, az S1 és S2 szubsztrátkötőhely pedig nemcsak a szubsztrátok kötéséért felelős, hanem az egyes kötőhelyek további szerephez is jutnak.
- A prolin-oligopeptidáz esetében a szubsztrát aktív centrumba jutása a peptidáz és a propeller domén együttes, összehangolt szerkezetváltozását igényli. A propelleren keresztüli szubsztrátbejutás nem valószínű, a szubsztrát a két domén között közelítheti meg az aktív helyet.
- Nagyobb peptidok és fehérjék oligopeptidázok általi hidrolízisére csak extrém körülmények között, igen kis valószínűséggel kerülhet sor.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. Juhász T, Szeltner Z, Renner V and Polgar L „Role of the oxyanion binding site and subsites S1 and S2 in the catalysis of oligopeptidase B, a novel target for antimicrobial chemotherapy“ *Biochemistry* **41** (2002) 4096-106
2. Szeltner Z, Rea D, Juhász T, Renner V, Mucsi Z, Orosz G, Fulop V and Polgar L „Substrate-dependent competency of the catalytic triad of prolyl oligopeptidase“ *J Biol Chem* **277** (2002) 44597-605
3. Szeltner Z, Rea D, Juhász T, Renner V, Fulop V and Polgar L „Concerted structural changes in the peptidase and the propeller domains of prolyl oligopeptidase are required for substrate binding“ *J Mol Biol* **340** (2004) 627-37
4. Juhász T, Szeltner Z, Fulop V and Polgar L „Unclosed beta-propellers display stable structures: implication for substrate access to the active site of prolyl oligopeptidase“ *J mol Biol* **346** (2005) 907-17
5. Fuxreiter M, Magyar C, Juhász T, Szeltner Z, Polgar L and Simon I „Flexibility of prolyl oligopeptidase: molecular dynamics and molecular framework analysis of the potencial substrate pathways“ *Proteins* **60** (2005) 504-12
6. Juhász T, Szeltner Z and Polgar L „Properties of the prolyl oligopeptidase homologue from *Pyrococcus furiosus*“ *FEBS Lett* **580** (2006) 3493-7
7. Juhász T, Szeltner Z and Polgar L „Truncated prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus*“ *Proteins* **69** (2007) 633-43

További közlemények az oligopeptidázok működése témában:

1. Szeltner Z, Alshafee I, Juhász T, Parvari R and Polgar L „The PREPL A protein, a new member of the prolyl oligopeptidase family, lacking catalytic activity“ *Cell Mol Life Sci* **62** (2005) 2376-81
2. Kiss AL, Hornung B, Radi K, Gengeliczki Z, Sztaray B, Juhász T, Szeltner Z, Harmat V and Polgar L „The acylaminoacyl peptidase from *Aeropyrum pernix* K1 thought to be an exopeptidase displays endopeptidase activity“ *J Mol Biol* **368** (2007) 509-20